Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Loew

Sind nach in vitro-Untersuchungen mit Hirnschnitten in der überstehenden Incubationslösung Glycolyse-Enzyme nachweisbar?

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
DIETER TRAUTMANN

— 1970 —

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Prof. Dr. med. F. Loew

Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Loew

Sind nach in vitro-Untersuchungen mit Hirnschnitten in der überstehenden Incubationslösung Glycolyse-Enzyme nachweisbar?

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
DIETER TRAUTMANN

— 1970 —

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Prof. Dr. med. F. Loew

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Promotionsprüfung : 13. Mai 1970

Inhaltsverzeichnis

Seite:

I. Einleitung 1

II. Darstellung der eigenen Befunde

1. Enzymbestimmung (Methodik)

1.1 Allgemeine Methodik 4

1.2 Hexokinase-Nachweis 6

1.3 Phosphoglucose-Isomerase-Nachweis 7

1.4 Fructose-6-phosphat-Kinase-Nachweis 8

1.5 Aldolase-Nachweis 9

1.6 Triosephosphat-Isomerase-Nachweis 10

1.7 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Nachweis 11

1.8 3-Phosphoglycerat-Kinase-Nachweis 12

1.9 Phosphoglycerat-Mutase-Nachweis 13

1.10 Enolase-Nachweis 14

1.11 Pyruvat-Kinase-Nachweis 15

1.12 Lactat-Dehydrogenase-Nachweis 16

1.13 NAD-Nachweis 17

1.14 NADH-Nachweis 17

1.15 NAD-Nucleosidase-Nachweis 18

2. Enzymbestimmung (Ergebnisse)

2.1 Allgemeines über die Darstellung der Ergebnisse 19

2.2 Hexokinase-Aktivität 19

2.3 Phosphoglucose-Isomerase-Aktivität 20

2.4 Fructose-6-phosphat-Kinase-Aktivität 20

2.5 Aldolase-Aktivität 21

2.6 Triosephosphat-Isomerase-Aktivität 21

2.7 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität 22

2.8 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität 22
2.9 Phosphoglycerat-Mutase-Aktivität 23
2.10 Enolase-Aktivität 23
2.11 Pyruvat-Kinase-Aktivität 24
2.12 Lactat-Dehydrogenase-Aktivität 24
2.13 NAD-Gehalt 25
2.14 NADH-Gehalt 25
2.15 NAD-Nucleosidase-Aktivität 25
3. WARBURG-Versuche
3.1 Methoden 26
3.2 Ergebnisse 28

III. Besprechung der Befunde 31

IV. Zusammenfassung 35

V. Schrifttumsverzeichnis 36

VI. Verzeichnis der Abkürzungen 40

Lebenslauf

Einleitung

Im Rahmen einer größeren Versuchsserie wurde der Glucose-Stoffwechsel von Kaninchenhirnschnitten manometrisch gemessen (HERRMANN und DITTMANN). Diese Untersuchungen haben den Zweck, nach möglichen Unterschieden zwischen dem Stoffwechsel von normalem und ödematösem Hirngewebe zu suchen.

Neben der Auswahl möglichst optimaler Versuchsbedingungen ergibt sich bei Arbeiten mit Gewebeschnitten das Problem der Beständigkeit der Schnitte bei längerer "in vitro-Incubation". Bereits 1952 hatte AEBI bei Arbeiten mit Leberschnitten in vitro das Auswaschen von Zellinhaltsstoffen quantitativ untersucht, indem er Stickstoffbestimmungen in den Incubationslösungen durchführte. Er stellte dabei fest, daß beträchtliche Mengen stickstoffhaltiger Substanzen während des WARBURG-Versuches aus den Schnitten in die Incubationslösung übergingen. Er untersuchte auch quantitative Zusammenhänge zwischen Incubationsbedingungen und Menge der freigesetzten N-haltigen Substanzen, und er entwickelte ein Incubationsmedium, das bei Leberschnitten den Stickstoffverlust in vitro möglichst niedrig hält. Über die Art der aus den Schnitten in die Lösung übergetretenen Substanzen machte er allerdings keine Untersuchungen. Insbesondere wurde auch nicht bestimmt, ob freigesetzte Proteine Bestandteile von Enzymen sind.

Bei unseren Versuchen wurde nach teilweiser Trepanation des Schädels durch epidurale Einwirkung eines auf -70° gekühlten Metallstempels ein umschriebenes Hirnödem in der einen Hemisphäre hervorgerufen. Am nächsten Tag wurde das Tier durch Luftembolie getötet, das Gehirn entnommen. Von einander genau entsprechenden Arealen wurden Schnitte hergestellt. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydbildung durch die Schnitte wur-

den in bicarbonat- und glucosehaltiger Salzlösung manometrisch gemessen. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß die Schnitte der ödematösen Hemisphäre leicht erhöhten Sauerstoffverbrauch und um circa 30% erhöhte Kohlendioxydbildung hatten. Die Incubationslösungen dieser Versuche wurden zur Bestimmung von Glucose, Milchsäure, Brenztraubensäure und anderen Substanzen tiefgefroren aufbewahrt. Beim Auftauen dieser Proben wurden regelmäßig Trübungen sichtbar, die auf Eiweißausscheidungen schließen ließen. Dieser Punkt muß aus folgendem Grund besonders beachtet werden: wenn das ödematöse Hirngewebe tatsächlich einen stärkeren Glucoseabbau in vitro zeigt als das ungeschädigte Hirngewebe, so kommt diesem Befund möglicherweise eine biochemische oder gar therapeutische Bedeutung zu. Wenn andererseits nach dem WARBURG-Versuch in der Incubationslösung Proteine auftreten, so ergibt sich die wichtige Frage, ob der gesteigerte Stoffwechsel tatsächlich nur innerhalb der Gewebeschnitte ablief, oder ob möglicherweise alle für den Ablauf der Glykolyse notwendigen Enzyme und Coenzyme gegen Ende der WARBURG-Versuche auch in der überstehenden Lösung enthalten waren und auf diese Weise zusätzlich zu dem Stoffwechsel innerhalb der Schnitte noch einen extrazellulären Beitrag lieferten.

In der neurologischen Diagnostik interessiert unter anderem die Frage des Auftretens von Enzymen im Liquor von Patienten. Trotz zahlreicher Arbeiten (DAVIES-JONES; DITTMANN; KLUGE; RASMUSSEN und KLATZO; SITZMANN; WIECHERT und BRETSCHNEIDER; WOLINTZ, JACOBS, CHRISTOFF, SOLOMON, CHERNIK; Übersichten siehe: BERGMEYER; DOCUMENTA GEIGY; SCHMIDT) sind bisher nur relativ wenige Enzyme in höherer Aktivität im Liquor nachgewiesen worden, und die Zusammenhänge zwischen neurologischem Befund und Nachweisbarkeit von Liquorenzymen sind noch nicht befriedigend geklärt. Trotz der großen Unterschiedlichkeit der

Materialien und der mechanischen Verhältnisse kann man vielleicht doch das Übertreten von Enzymen aus Schnitten in die Incubationslösung als einen Modellfall für den Übergang von Enzymen aus einem geschädigten Gehirn in den Liquor betrachten. Aus diesem Grund scheint es interessant, der Frage nachzugehen, ob und welche Enzyme in den Versuchslösungen nachweisbar sind.

Aus zwei Gründen wurden die Aktivitäten der Enzyme der Glycolyse im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

1. Die Milchsäurebildung hat neben der Atmung den wesentlichsten Anteil am Energiestoffwechsel der Glucose.
2. Bei den bisherigen Untersuchungen (HERRMANN und DITTMANN) zeigte sich gerade die Steigerung der Glycolyse als wesentlichstes Merkmal des Stoffwechsels im ödematös veränderten Hirngewebe.

Aus den geschilderten Beobachtungen und Überlegungen ergibt sich die Fragestellung der vorliegenden Arbeit:
Sind nach in vitro-Untersuchungen mit Hirnschnitten in der überstehenden Incubationslösung Glycolyse-Enzyme nachweisbar ?

II. Darstellung der eigenen Befunde

1. Enzymbestimmung (Methodik)

1.1 Allgemeine Methodik

Jedes Enzym wurde in den Lösungen von zwei manometrischen Versuchen bestimmt, wobei entsprechend der Anordnung der manometrischen Versuche folgende Einteilung bestand:

Enzym-Nachweis
Versuch Nr.

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle		
Gegenwart einer Substanz		

(Es wurde während jedes WARBURG-Versuches eine Substanz zugefügt; dabei handelte es sich um Arzneimittel, Hemmstoffe oder Aktivatoren des Stoffwechsels, sowie Intermediärprodukte des Glucosestoffwechsels.) Aus jeder der vier Gruppen lagen von jedem WARBURG-Versuch zwei Proben vor.

Bei der Aktivitätsmessung der Enzyme wurden die allgemeinen Vorschriften beachtet (BERGMEYER; HESS und BRAND). Bei Aldolase, Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase wurden Original-Testpackungen von BOEHRINGER, Mannheim verwendet. Dabei wurden die für Aktivitätsbestimmungen in hochaktiven Enzympräparaten ausgearbeiteten Vorschriften jeweils so modifiziert, daß die Konzentrationen sämtlicher Substanzen unverändert blieben, jedoch immer 0,5 ml K-Lösung anstelle der 0,01 oder 0,02 ml Enzymsuspension als unbekannte Probe in die Küvette gegeben wurden.

Bei einigen Enzymbestimmungen (PK, Enolase, PGM, PGK, GAPDH,

HK und PGI) wurden Mg^{++} bzw. K^{+} als Cofaktoren zugefügt. Die Zusätze von Glycerat-2,3-diphosphat bei PGM-Bestimmung und Fructose-1,6-diphosphat bei F-6-P-K-Bestimmung haben nach Angaben von BOEHRINGER den Sinn, allosterische Enzyme (ATKINSON; LEHNINGER; NING, PURISCH und FROMM) zu maximaler Wirkung zu aktivieren. Der Zusatz von Monojodacetat bei der ALD-Bestimmung verhindert die glycolytische Umsetzung der Spaltprodukte von Fructose-1,6-diphosphat.

Alle Messungen wurden in einem EPPENDORF-Photometer mit temperiertem Küvettenhalter durchgeführt. Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke, Wellenlänge 334 nm, Photozelle 90 b, Temperatur 25° (bei Aldolase 37°). Die bei -40° gelagerten Proben wurden grundsätzlich vor jeder Messung 10 Minuten bei circa 3000·g zentrifugiert und vom Niederschlag dekantiert.

Hexokinase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität(mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung (mg/ml)	
TRA[x]	21,20	0,79	80,38	Hydrochlorid	14,93
Glucose	201,80	1,20	504,60	Monohydrat	100,0
$MgCl_2$	6,70	0,20	100,0	Hexahydrat	20,32
NADP	0,76	0,20	11,43	Na-Salz	10,0
ATP	0,54	0,10	16,17	Na-Salz	10,0
G-6-PDH		0,01		BOEHRINGER Reinheitsgr.I	1,0
Probe		0,50			

Mess-Methode:

Es wurde 6 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. (Erfassung der Hexokinase-Aktivität, die auch in "G-6-PDH, Reinheitsgrad I" in geringer Menge als Verunreinigung enthalten ist.) Start mit 0,5 ml K-Lösung, anschließend Messung der Zunahme der Extinktion während 6 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 7,6 zu 1 mg Triäthanolamin·HCl 0,0108 ml 0,2 N NaOH zugefügt wird.

Phosphoglucose-Isomerase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$F\text{-}6\text{-}P \xrightarrow{PGI} G\text{-}6\text{-}P$$

$$G\text{-}6\text{-}P \xrightarrow{G\text{-}6\text{-}PDH} Gluconat\text{-}6\text{-}P + NAPDH + H^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung	(mg/ml)
TRA[x]	85,67	2,09	122,97	Hydrochlorid	22,83
$MgCl_2$	6,67	0,20	100,0	Hexahydrat	20,32
NADP	0,38	0,10	11,43	Na-Salz	10,0
G-6-PDH		0,01			0,5
Probe		0,50			
F-6-P	1,17	0,10	34,97	Na-Salz	13,0

Mess-Methode:

Es wurde 6 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,1 ml Fructose-6-phosphat, anschließend Messung der Zunahme der Extinktion während 6 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 7,6 zu 1 mg Triäthanolamin·HCl 0,0108 ml 0,2 N NaOH zugefügt wird.

Fructose-6-phosphat-Kinase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{F-6-P} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{F-6-PK}} \text{F-1,6-P}_2 + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactat} + \text{NAD}^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung	(mg/ml)
Tris[x]	71,67	1,66	129,52		15,67
$MgSO_4$	1,35	0,05	81,14	Heptahydrat	20,0
KCl	4,47	0,05	268,28		20,0
PEP	0,70	0,10	21,07	CHA-Salz	10,0
ATP	1,08	0,20	16,17	Na-Salz	10,0
NADH	0,39	0,10	11,72	Na-Salz	10,0
PK		0,03			2,0
LDH		0,01			5,0
Probe		0,50			
F-6-P	1,97	0,20	29,59	Na-Salz	10,0
$F\text{-}1,6\text{-}P_2$	0,65	0,10	19,41	Na-Salz	10,0

Mess-Methode:

Es wurde 20 Minuten lang in 2-Minuten-Intervallen E gemessen. (Die Extinktion nahm ununterbrochen ab; Hauptursache vermutlich Adenosintriphosphatase-Aktivität in der Lösung). Start mit Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-diphosphat, anschliessend Messung der Abnahme der Extinktion während 4 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 8,5 zu 1 mg Tris 0,01983 ml 0,1 N HCl zugefügt wird.

Aldolase-Nachweis

Test-Prinzip:

$F\text{-}1,6\text{-}P_2 \xrightarrow{ALD} GAP + DAP$

$GAP \xrightarrow{TIM} DAP$

$2\ DAP + 2\ NADH + 2\ H^+ \xrightarrow{GDH} 2\ Glycerin\text{-}1\text{-}P + 2\ NAD^+$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung (mg/ml)
Collidinpuffer pH=7,4	50,72	2,50	56,0	UV-Test
F-1,6-P_2	2,72		3,0	BOEHRINGER
Monojodacetat	0,27		0,3	Original-
NADH	0,36	0,05	20,0	
GDH		0,01		Packung
TIM				
Probe	0,20			

Mess-Methode:

Die Reaktionstemperatur betrug 37°. Es wurde Extinktion E_1 gegen Leerwert (2,50 ml Wasser + 0,20 ml Probe) gemessen und genau nach 20 Minuten die Abnahme der Extinktion E_2.
$E_1 - E_2 = E$. Durch die Messung bei 37° bedingte Erhöhung der Aldolase-Aktivität ist von BOEHRINGER im Faktor für die rechnerische Auswertung berücksichtigt.

Triosephosphat-Isomerase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$GAP \xrightarrow{TIM} DAP$$

$$DAP + NADH + H^+ \xrightarrow{GDH} Glycerin\text{-}1\text{-}P + NAD^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung	(mg/ml)
TRA[x]	240,0	1,94	371,1	Hydrochlorid	68,91
NADH	0,195	0,05	11,72	Na-Salz	10,0
GDH		0,01			10,0
Probe		0,50			
D-Glycerinaldehyd-3-phosphat	0,53	0,50	3,16	DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat-diäthylacetal, Ba-Salz	3,0

Mess-Methode:

Es wurde 6 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,5 ml Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lösung, anschliessend Messung der Abnahme der Extinktion während 6 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 7,6 zu 1 mg Triäthanolamin·HCl 0,0108 ml 0,2 N NaOH zugefügt wird.

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Glycerat-3-P} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PGK}} \text{Glycerat-1,3-P}_2 + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerat-1,3-P}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GAPDH}} \text{GAP} + \text{NAD}^+ + \text{P}_i$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung (mg/ml)	
TRA[x]	82,33	1,98	124,75	Hydrochlorid	23,17
ATP	1,08	0,10	32,33	Na-Salz	20,00
EDTA	0,90	0,10	26,87	Di-Na-Salz	20,00
$MgSO_4$	2,00	0,06	100,00	in Puffer Heptahydrat	24,65
NADH	0,20	0,05	11,72	Na-Salz	10,00
PGK		0,01			10,00
Probe		0,50			
Glycerat-3-P	6,09	0,20	91,35	Ba-Salz[xx]	33,33

Mess-Methode:

Es wurde 9 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,20 ml Glycerat-3-phosphat, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 18 Minuten[xxx] in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 7,6 zu 1 mg Triäthanolamin·HCl 0,0108 ml 0,2 N NaOH zugefügt wird.

xx) in Pufferlösung unter Zusatz von 0,183 ml 1 N H_2SO_4/ml, nach Fällung zentrifugiert.

xxx) Die Reaktion lief zunächst nicht linear mit der Zeit. Ausgewertet wurde die Extinktionsänderung pro Minute zwischen der 11. und der 17. Minute.

3-Phosphoglycerat-Kinase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Glycerat-3-P} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PGK}} \text{Glycerat-1,3-P}_2 + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerat-1,3-P}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GAPDH}} \text{GAP} + \text{NAD}^+ + \text{P}_i$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung (mg/ml)	
TRA[x]	84,00	2,04	123,53	Hydrochlorid	22,94
ATP	1,08	0,20	16,17	Na-Salz	10,00
EDTA	0,45	0,05	26,87	Di-Na-Salz	10,00
$MgSO_4$	6,67	0,04	500,00	in Puffer Heptahydrat	123,25
NADH	0,20	0,05	11,72	Na-Salz	10,00
GAPDH		0,02			5,00
Probe		0,50			
Glycerat-3-P	3,05	0,10	91,35	Ba-Salz[xx]	33,33

Mess-Methode:

Es wurde 12 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,10 ml Glycerat-3-phosphat, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 18 Minuten[xxx] in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 7,6 zu 1 mg Triäthanolamin·HCl 0,0108 ml 0,2 N NaOH zugefügt wird.

xx) in Pufferlösung unter Zusatz von 0,183 ml 1 N H_2SO_4/ml, nach Fällung zentrifugiert.

xxx) Die Reaktion lief zunächst nicht linear mit der Zeit. Ausgewertet wurde die Extinktionsänderung pro Minute zwischen der 11. und der 17. Minute.

Phosphoglycerat-Mutase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Glycerat-3-P} \xrightarrow{\text{PGM}} \text{Glycerat-2-P}$$
$$\text{Glycerat-2-P} \xrightarrow{\text{Enolase}} \text{PEP} + H_2O$$
$$\text{PEP} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$
$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactat} + NAD^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung (mg/ml)	
TRA[x]	85,67	2,09	122,97	Hydrochlorid	22,83
ADP	0,56	0,10	16,85	Na-Salz	10,00
$MgSO_4$	1,00	0,03	100,00	Heptahydrat	24,65
NADH	0,20	0,05	11,72	Na-Salz	10,00
LDH		0,01			5,00
PK		0,01			2,00
Enolase		0,01			10,00
Probe		0,50			
Glycerat-3-P	4,57	0,15	91,35	Ba-Salz[xx]	33,33
Glycerat-2,3-P_2	0,12	0,05	7,06	CHA-Salz	6,00

Mess-Methode:

Es wurde 9 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,15 ml Glycerat-3-phosphat, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 6 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 7,6 zu 1 mg Triäthanolamin·HCl 0,0108 ml 0,2 N NaOH zugefügt wird.

xx) in Pufferlösung unter Zusatz von 0,183 ml 1 N H_2SO_4/ml, nach Fällung zentrifugiert.

Enolase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Glycerat-2-P} \xrightarrow{\text{Enolase}} \text{PEP} + H_2O$$

$$\text{PEP} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactat} + NAD^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung	(mg/ml)
TRA[x]	81,33	1,96	124,49	Hydrochlorid	23,12
ADT	1,12	0,20	16,85	Na-Salz	10,00
$MgSO_4$	25,00	0,05	1500,00	Heptahydrat	369,75
KCl	100,00	0,10	3000,00		223,65
NADH	0,20	0,05	11,72	Na-Salz	10,00
LDH		0,02			2,00
PK		0,02			2,00
Probe		0,50			
Glycerat-2-P	1,80	0,10	53,96	Na-Salz	20,00

Mess-Methode:

Es wurde 10 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,1 ml Glycerat-2-phosphat, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 6 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

x) wobei für pH 7,6 zu 1 mg Triäthanolamin·HCl 0,108 ml 0,2 N NaOH zugefügt wird.

Pyruvat-Kinase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$PEP + ADP \xrightarrow{PK} Pyruvat + ATP$$

$$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} L\text{-}Lactat + NAD^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung (mg/ml)
TRA pH 7,5	123,10		160,00	
KCl	92,30	2,50	120,00	
$MgSO_4$	16,20		21,00	UV-Test BOEHRINGER Original-Packung
EDTA	1,00		1,30	
NADH	0,18	0,10	6,00	
PEP	1,00		32,50	
LDH		0,05		0,50
Probe		0,50		
ADP	3,08	0,10	100,00	

Mess-Methode:

Zunächst Extinktionsänderung innerhalb 10 Minuten messen, dann mit 0,10 ml Adenosindiphosphat-Lösung starten und wiederum Abnahme der Extinktion innerhalb 10 Minuten bei 25° messen.

Lactat-Dehydrogenase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactat} + \text{NAD}^+$$

Reagenzien:

Substanz	Endmolarität (mM)	Testlsg. (ml)	Molarität (mM)	Zusammensetzung (mg/ml)
Phosphatpuffer pH 7,5	46,83		50,00	UV-Test BOEHRINGER Original-Packung In 110 ml Pufferlösung 9 mg Natriumpyruvat lösen. (DITTMANN, 1968)
Natriumpyruvat	0,98		1,04	
NADH	0,286	0,10	9,00	
Probe		0,10		

Mess-Methode:

Start mit 0,10 ml Probe, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 6 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

1.13

NAD-Nachweis

1,2 ml K-Lösung werden mit
0,3 ml 3 M Trichloressigsäure enteiweißt.
(4,90 g TCA/10 ml gelöst)

In 2,59 ml Glycinpuffer (mit Alkohol und Semicarbazid) werden
0,40 ml des vorstehenden Überstandes
mit 0,01 ml Alkoholdehydrogenase (30 mg/ml) incubiert.

Aus der Zunahme der Extinktion bei 334 nm wird der NAD-Gehalt berechnet.

Herstellung des Glycinpuffers:

132,4 ml Glycin-NaCl-Lösung, bestehend aus 795,4 mg NaCl + 1024,4 mg Glycin/200 ml,
10,0 ml 2 N NaOH
6,6 g $Na_4P_2O_7 \cdot 10\ H_2O$
1,68g Semicarbazidhydrochlorid und
2,0 ml Äthanol werden gemischt, der pH-Wert wird mit 2 N NaOH auf 9,8 eingestellt. Mit Wasser wird auf 200 ml aufgefüllt.

1.14

NADH-Nachweis

1,0 ml K-Lösung werden mit
0,5 ml 1 N alkoholischer KOH (5,6 g KOH in 100 ml Äthanol) enteiweißt;
Mit Triäthanolamin-HCl-Phosphatmischung (9,30 g Triäthanolaminhydrochlorid
5,44 g KH_2PO_4
1,74 g K_2HPO_4/100 ml)
wird auf pH 7,8 gebracht und zentrifugiert und der Überstand wird mit Wasser auf 5,0 ml aufgefüllt.

2,000 ml Überstand werden mit
0,005 ml 1 M Pyruvat-Lösung (1,10 g Natriumpyruvat/10 ml) gemischt.
Aus der Abnahme der Extinktion nach Zugabe von
0,005 ml LDH (0,5 mg/ml) wird der NADH-Gehalt berechnet.

1.15
NAD-Nucleosidase-Nachweis

0,60 ml Phosphatpuffer, 0,1 M; pH 7,3
0,20 ml NAD-Lösung (5 mg/ml)
0,40 ml K-Lösung werden 20 Minuten bei 37° incubiert. Nach Enteiweißung mit
0,3 ml 3 M Trichloressigsäure wird zentrifugiert. In
0,40 ml Überstand wird in
2,59 ml Glycinpuffer, 0,045 M; pH 9,8 (33 mg Natriumphosphat, 8,4 mg Semicarbazid·HC 0,01 ml Äthanol/ml)
mit
0,01 ml Alkoholdehydrogenase (30 mg/ml) bei 334 nm das noch vorhandene NAD bestimmt.
In einem Leerversuch wird NAD-Lösung nach vorstehendem Ansatz mit 0,40 ml Wasser anstelle von 0,40 ml Pr be incubiert.

II.2 Enzymbestimmung (Ergebnisse)

2.1 Allgemeines über die Darstellung der Ergebnisse

Wie bereits unter 1.1 erwähnt, lagen von jedem manometrischen Versuch acht Proben vor, vier von der ungeschädigten Hemispäre und vier von der ödematösen Hemisphäre, wobei jeweils zur Hälfte aller Gefäße eines Versuches eine Substanz zugegeben worden war. In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse entsprechend der Anordnung unserer manometrischen Versuche aufgeschlüsselt. Dabei ist jeweils der Mittelwert von zwei zusammengehörigen Bestimmungen unter Zusatz der mittleren Streuung angegeben. Neben den Versuchsnummern ist in Tabellen auch angegeben, welche Substanz jeweils zugekippt worden war.

2.2 Hexokinase-Aktivität

Versuch B4

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	0	$0,6 \pm 0,3$
Cycl. AMP	$-0,2 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,3$

Versuch B9

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	$0,1 \pm 0$	$0,2 \pm 0,1$
Solu-Decortin	$0,8 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,2$

2.3
Phosphoglucose-Isomerase-Aktivität

Versuch A10

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	198±22	267±10
Dexascheroson	292±29	270± 8

Versuch A9

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	230± 4	233± 6
Hypoglycin A	227±13	259±13

2.4
Fructose-6-phosphat-Kinase-Aktivität

Versuch C7

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	0	0
Sorbit	0	0

Versuch E1

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	0	0
Hydergin	0	0

2.5
Aldolase-Aktivität

Versuch C4

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	68±14	67± 8
Cycl. AMP	76± 7	159± 1

Versuch A8

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	83±14	69± 6
Hypoglycin A	78±39	83± 2

2.6
Triosephosphat-Isomerase-Aktivität

Versuch C2

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	864± 44	1103±243
G-6-P	928±103	1000± 0

Versuch C1

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	1321± 0	1600± 36
G-1-P	1277±170	1623± 58

2.7
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Versuch B10

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	7± 2	5± 1
H 177	3± 1	6± 2

Versuch B8

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	3± 1	5± 1
Solu-Decortin	4± 0	7± 1

2.8
3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität

Versuch C8

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	22± 1	31± 4
Glucose	26± 2	26± 2

Versuch D10

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	19± 1	50± 5
Silymarin	45± 0	53± 2

2.9
Phosphoglycerat-Mutase-Aktivität

Versuch C10

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	144± 4	182±18
G-6-P	96± 4	173± 3

Versuch E2

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	170±63	184± 7
ADP	184± 1	243±29

2.10
Enolase-Aktivität

Versuch B7

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	49± 3	52± 0
Solu-Decortin	55± 2	46± 0

Versuch C6

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	11± 1	24± 0
Sorbit	27± 1	24± 1

2.11
Pyruvat-Kinase-Aktivität

Versuch C5

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	48± 3	57±12
Cycl. AMP	51± 4	36±13

Versuch A5

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	73± 0	66± 3
Cycl. AMP	63± 5	59± 5

2.12
Lactat-Dehydrogenase-Aktivität

Versuch A1

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	75± 4	105± 6
Na-Ascorbat	77± 2	99± 5

Versuch A2

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	72± 0	102± 6
Insulin	80± 4	85± 4

2.12

Versuch B3

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	49± 2	44± 1
Cycl. AMP	46± 4	40± 5

2.13

NAD-Gehalt

Die Bestimmung wurde nach der unter 1.13 beschriebenen Methode durchgeführt, es wurde jedoch niemals NAD gefunden, obwohl es in jeweils vier Gefäßen von zwei WARBURG-Versuchen zugesetzt worden war. Die Endkonzentration betrug 0,5 bzw. 1 millimolar.

2.14

NADH-Gehalt

Obwohl auch NADH in zwei Versuchen zugesetzt worden war, Endkonzentrationen 0,5 bzw. 1 millimolar, war auch NADH niemals in den Proben nachweisbar.

2.15

NAD-Nucleosidase-Aktivität

Versuch A1

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	30± 6	34± 9
H 177	26± 3	36± 4

Versuch C3

2.15

Versuch C3

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	31± 1	28± 2
F-1,6-P_2	25± 4	34± 0

II.3 WARBURG-Versuche

Obwohl es nach den beschriebenen Messungen wegen des Fehlens von Hexokinase und Phosphofructokinase als absolut unmöglich gelten kann, daß bei den Stoffwechselmessungen extrazellulär Milchsäure gebildet wurde, wurde das für die Fragestellung wichtige Problem noch auf einem anderen unabhängigen Weg bearbeitet: Nach einem normalen WARBURG-Versuch mit Hirnschnitten wurden die Schnitte von der Incubationslösung durch Zentrifugieren abgetrennt, mit dem klaren Überstand wurde ein neuer Stoffwechselversuch angesetzt, und es wurde geprüft, ob in diesem zweiten Versuch bei Abwesenheit von Hirnschnitten noch Milchsäure gebildet wird.

3.2
Methoden

Gearbeitet wurde nach der neuen manometrischen Zwei-Gefäß-Methode von WARBURG. Die Kaninchen wurden durch Luftembolie getötet, nach Eröffnung des Schädels wurde das ganze Gehirn herausgenommen und sofort in eisgekühlte Incubationslösung zum Waschen gegeben. Das Präparieren wurde in einer Petrischale durchgeführt, die mittels einer Eiswassermischung gekühlt wurde: Entfernen von Arachnoidea und kleinen Blutge-

fäßen, Herausschneiden korrespondierender Abschnitte aus beiden Hemisphären, Herstellung von Schnitten mit maximal 0,3 mm Dicke und 0,5 mm Kantenlänge. Das Waschen und der anschließende manometrische Versuch wurden mit einer Incubationsflüssigkeit durchgeführt, die abgekürzt "K-Lösung" genannt wird und folgende Zusammensetzung hat:

Na^+	140,4 millimolar
K^+	5,0 millimolar
Ca^{++}	2,5 millimolar
Mg^{++}	0,8 millimolar
Cl^-	115,7 millimolar
HCO_3^-	25,0 millimolar
HPO_4^{--}	1,2 millimolar
$H_2PO_4^-$	0,3 millimolar
SO_4^{--}	0,8 millimolar
D-Glucose	10,0 millimolar

Nach mehrmaligem Waschen und Dekantieren wurden die Schnitte mit einer Pinzette möglichst gleichmäßig auf die vorbereiteten Reaktionsgefäße verteilt. Entsprechend der angewandten Zwei-Gefäß-Methode ergaben sich folgende Gefäßfüllungen:

Gefäß I	Gefäß II
Großer Anhang 3,0 ml Wasser	2,9 ml 3 M $KHCO_3$-K_2CO_3-Puffer (79-21)
	0,1 ml Wasser mit 2 mg Carboanhydrase

Hauptraum: 3 ml K-Lösung

Begast wurde mit einem Gemisch von 75% N_2, 20% O_2 und 5% CO_2 unter leichtem Schütteln im Thermostaten bei 38°.

Nach beendetem manometrischen Versuch (40 Min. bzw. 3 Std. Dauer) wurden die Suspensionen der Schnitte mittels leicht gekrümmten Glasröhrchens und Gummisaugern aus den Gefäßen

entfernt und 10 Minuten bei 3000·g abzentrifugiert.

Die überstehende klare Lösung wurde für beide Gefäße jedes Paares gemischt und mit der gleichen Menge frischer K-Lösung verdünnt. Diese Verdünnungen wurden in genau der gleichen Weise, wie für den manometrischen Versuch mit Schnitten beschrieben, in neue Reaktionsgefäße eingefüllt (siehe obiges Schema). Nach erneutem Begasen wurde der zweite manometrische Versuch analog dem vorangegangenen Versuch durchgeführt. Wegen der äußerst geringen Druckänderungen wurde der Versuch allerdings ohne Schütteln der Gefäße über Nacht laufen gelassen; nach viertelstündiger Schüttelung wurde dann morgens noch einmal abgelesen.

Zur Kontrolle des manometrischen Versuches wurden Glucose und Milchsäure in den Lösungen aus den Reaktionsgefäßen nach Enteiweißung mit Perchlorsäure auch chemisch bestimmt. (Mittels der spezifischen optischen Tests mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bzw. mit LDH.)

3.2
Ergebnisse

Die Ergebnisse werden, wie in der Manometrie üblich, in Form der Stoffwechselcoeffizienten Q_M und Q_{O_2} angegeben:

Versuch 1	Q_M $\frac{\mu L\ CO_2}{mg\ Trs. \times Std.}$	Q_{O_2} $\frac{\mu L\ O_2}{mg\ Trs. \times Std.}$
40 Min.-Probe	+ 0,5	- 0,9
180 Min.-Probe	+ 1,0	- 1,2
Versuch 2		
40 Min.-Probe	+ 0,45	- 0,08
180 Min.-Probe	+ 0,06	- 0,35

Wegen besserer Vergleichsmöglichkeit wurden auch die Ergebnisse der chemischen Milchsäurebestimmungen in Q-Werte umgerechnet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Versuch 1	Q_M $\frac{\mu L\ CO_2}{mg\ Trs. \times Std.}$
40 Min.-Probe	0,030
180 Min.-Probe	0,007
Versuch 2	
40 Min.-Probe	0,030
180 Min.-Probe	0,380

Mit "40 Min.-Probe" ist gemeint, daß der klare Überstand von Schnitten verwendet wurde, die in einem vorangegangenen WARBURG-Versuch 40 Minuten incubiert worden waren, entsprechend stellen die "180 Min.-Proben" den Überstand anderer Schnitte aus dem gleichen manometrischen Versuch mit 180 Minuten Dauer dar. Die Versuchsdauer der Messungen ohne Schnitte betrug 16,3 Stunden (Versuch 1) bzw. 17,5 Stunden (Versuch 2).

Da die Ergebnisse von Glucose-Bestimmungen nur schwerlich in Q-Werten auszudrücken sind, besser dagegen als ug Glucoseverbrauch pro mg Trockensubstanz angegeben werden, sind neben den Glucose-Werten auch noch einmal die Milchsäurewerte der vorigen Seite auf Gewichtsbasis angegeben:

Versuch 1	ug Lactat/mg Trs.	ug Glucose/mg Trs.
40 Min.-Probe	+ 1,7	- 21,8
180 Min.-Probe	+ 0,5	- 86,8
Versuch 2		
40 Min.-Probe	+ 2,3	- 23,3
180 Min.-Probe	+ 26,8	- 31,4

Die manometrischen Versuche wurden zwangsläufig mit unsteri-

len Lösungen durchgeführt. Die mehr als 16-stündige Versuchsdauer widerspricht in diesem Fall völlig den Arbeitsregeln in der manometrischen Technik. (Die langen Versuchsdauern waren aber nötig, da sich innerhalb einer Stunde die Drucke nicht meßbar änderten.) Entsprechend der unsterilen Arbeitsweise wurden auch recht widersprüchliche Ergebnisse erhalten:

a. In Versuch 2 waren die Verhältnisse von Glycolyse zur Atmung bei der 40 Min.-Probe und der 180 Min.-Probe völlig gegensätzlich, obwohl fast identisches Material in Gegenwart des gleichen Gases incubiert wurde.

b. Es besteht keine Parallele zwischen dem aus manometrischen Untersuchungen und den aus chemischen Bestimmungen berechneten Q_M-Werten der Milchsäurebildung. Über fehlende Übereinstimmung der Zahlenwerte hinaus sind sogar die Relationen zwischen 40 Min.-Proben und 180 Min.-Proben vertauscht.

c. Selbst innerhalb der Tabelle der durch chemische Bestimmung erhaltenen Ergebnisse bestehen weder angenäherte Übereinstimmung der Zahlenwerte einer Spalte noch Ähnlichkeit der Verhältnisse zwischen Stärke der Glycolyse und Stärke der Atmung.

Bei den sonst üblichen manometrischen Versuchen von etwa drei Stunden Dauer werden in den Punkten, die soeben kritisch besprochen wurden, gute Übereinstimmung erzielt. (Angenäherte Konstanz der Q-Werte selbst sowie der Verhältnisse zwischen Glycolyse und Atmung bei bestimmten Versuchsbedingungen; außerdem auch relativ gute Übereinstimmung zwischen manometrisch und enzymatisch bestimmter Milchsäurebildung.

Wenn entgegen den sonst üblichen Erfahrungen bei diesen Langzeitversuchen mit zellfreien Überständen so schlechte Relationen erhalten wurden, so ist die Erklärung einzig in Verunreinigungen der Versuchsansätze durch Mikroorganismen zu sehen.

IV. Besprechung der Befunde

Die Diskussion soll sich auf foldende Fragen erstrecken:

1. Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Enzyme.
2. Vergleich innerhalb jedes Einzelversuches.
3. Kritische Besprechung der negativen Befunde.
4. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren.
5. Konsequenz für die Bewertung der manometrischen Versuche.

1. Die mit Abstand höchste Aktivität wurde bei der Triosephosphat-Isomerase gefunden. Ordnet man alle überprüften Enzyme in der Reihenfolge abnehmender Aktivität, so ergibt sich folgendes Bild:

Triosephosphat-Isomerase > Phosphoglucose-Isomerase, Phosphoglycerat-Mutase > Lactat-Dehydrogenase, Aldolase, Pyruvatkinase, Enolase und 3-Phosphoglycerat-Kinase > Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase > Hexokinase > Fructose-6-phosphat-Kinase, wobei letztere überhaupt nicht gefunden wurde.

2. Flüchtige Betrachtung der Ergebnisse jedes einzelnen Versuches mag zunächst den Eindruck entstehen lassen, daß Unterschiede in der Enzymfreisetzung aus der ungeschädigten und der ödematösen Hemisphäre bestehen, oder Unterschiede durch den Zusatz bestimmter Substanzen hervorgerufen wurden: Phosphoglucose-Isomerase in Versuch A10, Lactat-Dehydrogenase in Versuch A1 und A2, Triosephosphat-Isomerase in Versuch C1, Phosphoglycerat-Kinase in Versuch D10, Phosphoglycerat-Mutase in Versuch C10. In diesen Fällen wurden aus den Schnitten der ödematösen Seite höhere Enzymaktivitäten freigesetzt als aus der Kontrollseite. Die erwähnten Unterschiede sind in den meisten Fällen auch statistisch zu sichern, trotzdem sollten quantitative Betrachtungen nur mit großer Vorsicht durchgeführt werden. Es ist beispielsweise schwer verständlich,

weshalb Dexascheroson die Permeabilität der Membranen steigert. Sämtliche Ergebnisse sind aber aus folgendem Grunde nur bedingt quantitativ interpretierbar:
Grundsätzlich kann ein lösliches Enzym auf zwei Wegen aus dem Zellinneren in die Incubationslösung gelangen: durch die Diffusion und das Aufbrechen ganzer Zellen. Bei mehrstündigen in vitro-Incubationen unter Schütteln ist nicht auszuschliessen, daß gelegentlich auch Zellen so beschädigt werden, daß ihre löslichen Bestandteile vollständig in der Incubationslösung vorhanden sind. Solche Vorgänge würden aber vermutlich die Aktivität einiger Enzyme im Überstand stark erhöhen.

3. Hexokinase wurde nur in äußerst geringen Aktivitäten gefunden, Fructose-6-phosphat-Kinase wurde niemals gefunden. In beiden Fällen wurde aber durch Zugabe des reinen Fermentes in stark verdünnter Lösung sichergestellt, daß der Test funktionierte. Diese Überprüfungen wurden stets in dem gleichen Reaktionsansatz durchgeführt, der vorher keine meßbare Aktivität zeigte. Durch diese Art der Überprüfung wurde ausgeschlossen, daß während der Vorincubationen vielleicht soviel Coenzym und Substrat verbraucht worden waren, daß die Reaktion gar nicht mehr ablaufen konnte. Die Prüfungen brachten also den Beweis, daß Hexokinase und Fructose-6-phosphat-Kinase nicht aus den Schnitten in aktiver Form in die Lösung übergegangen waren.

Auch Nicotinamid-adenin-dinucleotid wurde weder in der oxydierten noch in der reduzierten Form gefunden, obwohl beide Substanzen in den betreffenden Versuchen zur Hälfte aller Gefäße zugegeben worden waren. Auch hier wurde durch Zugabe der reinen Substanzen zum Testansatz nachgewiesen, daß der Test in Ordnung war. Für dieses Ergebnis gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: der manometrische Versuch lief nach Zugabe der Substanzen noch länger als zwei Stunden bei 38°. Die Dinucleotide können von den Zellen aufgenommen werden, sie können aber

auch außerhalb der Zellen durch die Nucleosidase, die aus den Hirnschnitten in die Incubationslösung gelangt ist, abgebaut werden. In diesem Zusammenhang muß auch die starke Steigerung der Sauerstoffaufnahme beachtet werden, die unmittelbar nach Zugabe von NADH zu der Incubationslösung eintrat.

4. PETTE hat in einer umfassenden neueren Arbeit die Extraktionsmethodik für Enzyme aus tierischen Geweben behandelt. Er gibt in Tabellenform auch die Enzymaktivitäten in der Hirnrinde von Ratten an. Dabei steht tatsächlich wie bei unseren Versuchen Triosephosphat-Isomerase mit Abstand an der ersten Stelle, während Hexokinase und Fructose-6-phosphat-Kinase nur sehr niedrige Aktivitäten besitzen. Quantitative Vergleiche zwischen Vollextrakten aus Rattenhirn und teilweisem Enzymaustritt aus Kaninchenhirnschnitten in vitro sind ohnehin nicht sinnvoll. Dennoch ist aber eine gewisse Parallele zwischen den Zahlenangaben von PETTE und unseren Befunden offensichtlich.
Mc ILWAIN berichtet über die Stabilität von Enzymen im Gehirn in situ nach dem Tod von Kaninchen und in bestimmten Hirnextrakten- bzw. Präparaten. Über Hexokinase wurden in diesem Zusammenhang keine Untersuchungen gemacht, aber in völliger Übereinstimmung mit unseren Befunden wurde festgestellt, daß Fructose-6-phosphat-Kinase außerhalb der Hirnzellen besonders unstabil ist.

5. Die wichtigste Fragestellung der vorliegenden Arbeit betraf die Konsequenzen für die Beurteilung der Ergebnisse unserer manometrischen Versuche. Die vorliegende Arbeit zeigt nun ganz klar, daß Glycolyse außerhalb der Hirnschnitte in der umgebenden Lösung nicht möglich ist. Es fehlen die Coenzyme NAD bzw. NADH und die Fructose-6-phosphat-Kinase-Aktivi-

tät. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Enzymbestimmungen ist auch das Ergebnis der beiden WARBURG-Versuche ohne Schnitte. In dem einen Gefäßpaar des einen Versuches wurde zwar eine nennenswerte Menge von Milchsäure gebildet. Man muß sich aber vor Augen halten, daß bei den manometrischen Versuchen aus methodischen Gründen unsteril gearbeitet wird. AEBI hält bereits Versuche von fünf Stunden Dauer für bedenklich, weil während der langen Versuchsdauer der Stoffwechsel durch Mikroorganismen verfälscht werden kann, die sich in der Lösung vermehren. Um so größer ist diese Gefahr bei unseren Versuchen mit über 16 Stunden Dauer. Trotzdem zeigen die hierbei ermittelten Q-Werte, daß sie nicht nur klein sind im Verhältnis zu den Q-Werten von Hirnschnitten, sondern sogar klein sind im Verhältnis zu den Unterschieden des Stoffwechsels von Schnitten der ungeschädigten und der ödematösen Hemisphäre. Das gleiche Ergebnis zeigen auch die chemischen Bestimmungen: während bei Versuchen mit Schnitten pro Stunde 15-20 µg Glucose/mg Trs. verbraucht und 10-15 µg Lactat/mg Trs. gebildet werden, liegen die Werte für den Überstand ohne Schnitte bei ca. 0,1 µg Lactat/mg Trs. und 1-4 µg Glucose/mg Trs.. Interessant ist auch der äußerst geringe Anteil der Milchsäurebildung am gesamten Glucoseverbrauch. Das legt die Vermutung nahe, daß der größte Teil der Glucose in den Versuchen ohne Schnitte entweder auf anderen Stoffwechselwegen (Mikroorganismen ?) oder nur unvollständig abgebaut wurde.

Wenn also bei manometrischen Versuchen unterschiedliche Stärke des Stoffwechsels von gesundem und ödematösem Hirngewebe gefunden wurde, dann entsprechen diese Unterschiede nicht irgendwelchen Stoffwechselvorgängen in der umgebenden Incubationslösung. Statt dessen sind sie echte, innerhalb der Gewebe lokalisierte Stoffwechselcharakteristika.

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde geprüft, ob bei Incubation von Schnitten des Kaninchenhirns in Salzlösungen glycolytische Enzyme an die Incubationslösung abgegeben werden. In abnehmender Reihenfolge der Aktivität wurden gefunden:
Triosephosphat-Isomerase mit mehr als 1000 Millieinheiten pro mg Trockensubstanz > Phosphoglucose-Isomerase, Phosphoglycerat-Mutase > Lactat-Dehydrogenase, Aldolase, Pyruvatkinase, Enolase und 3-Phosphoglycerat-Kinase > Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase > Hexokinase mit weniger als 1 Millieinheit pro mg Trockensubstanz. Fructose-6-phosphat-Kinase sowie oxydiertes und reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid wurden nicht gefunden, während NAD-Nucleosidase in nennenswerter Aktivität vorgefunden wurde.

In manometrischen Versuchen wurde festgestellt, daß die zellfreien Überstände von WARBURG-Versuchen mit Hirnschnitten in einem anschließenden WARBURG-Versuch nur noch äußerst geringen Stoffwechsel zeigen.

Aus den Ergebnissen wird gefolgert, daß bei in vitro-Versuchen mit Hirnschnitten praktisch nur innerhalb der Gewebe ablaufender Stoffwechsel gemessen wird, und daß die Unterschiede zwischen den Stoffwechseln normaler und ödematöser Gewebe echt sind.

Schrifttumsverzeichnis

1. AEBI, H.: Über die chemische und morphologische Natur der Stickstoffabgabe von Gewebsschnitten im WARBURG-Versuch
Biochim.Biophysica Acta 9, (1952):443-456

2. ATKINSON, D.E.: Regulation of enzyme activity
Annual rev.of biochem. 35, (1966):85-118

3. BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
1. Aufl. Weinheim, 1962: 3-42 und 697-699

4. BERGMEYER, H.U.: Grundlagen und Fortschritte der enzymatischen Analyse. Zschr.anal.Chem. 212, (1965):77

5. DITTMANN, J.: Lactatdehydrogenase im Liquor cerebrospinalis bei Kindern
Optimale Substrat- und Coenzymkonzentration, Normalwert
Dtsch.Z.Nervenheilk. 192, (1968):310-316

6. DAVIES-JONES, G.A.B.: Lactate dehydrogenase and glutamic oxalacetic transaminase of the cerebrospinal fluid in tumours of the central nervous system
J.Neurol.Neurosurg.Psychiat. 32, (1969):24

7. FRICK, E.: Über die Kreatin-Kinase im Liquor cerebrospinalis
Klin.Wschr. 19, (1967):973-977

8. GEIGY, HRSG.: Wissenschaftliche Tabellen
7. Aufl. Basel 1968: 634

9. HERRMANN, H.D.
und DITTMANN, J.: Untersuchungen des Stoffwechsels von ödematösem Hirngewebe
I. Veränderung des Stoffwechsels im Kälteödem des Kaninchenhirns manometrisch in vitro gemessen
Acta Neurochir. (im Druck 1970)

10. HEITMANN, R.
und STAMMLER, A.: Änderung von Enzymaktivitäten bei der Einengung von Liquor cerebrospinalis
Klin.Wschr. 5, (1966):273-276

11. HESS, B. und BRAND, K.: Grundlagen der Bestimmung von Enzymaktivitäten
Z.analyt.Chem. 201, (1964):125-146

12. KLUGE, H., WINKLER, G., WIECZOREK, V., und VOLLHARDT, A.: Adenosindesaminase im Liquor cerebrospinalis bei neurologisch-psychiatrisch Kranken
Klin.Wschr. 47, (1969):1268-1269

13. KLUGE, H., WIECZOREK, V., UNGER, F. und GREGER, J.: Über den Ursprung und das Verhalten der OCT[1] im Liquor cerebrospinalis bei neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen
Psychiat.Neurol., Basel 154, (1967):88-94

14. LEHNINGER, A.L.: Supramolecular organization of enzyme and membrane systems
Z.Naturwiss. 3, (1966):57-63

15. McILWAIN, H., and RODNIGHT, R.: Practical Neurochemistry
1. Aufl. London, Verlag Churchill 1962:224

16. NING, J., PURICH, D.L. and FROMM, J.: Studies on the kinetic mechanism and allosteric nature of bovine brain hexokinase
J.biol.chem. 244, (1969):3840-3846

17. PETTE, D.: Aktivitätsmuster und Ortsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels
Sonderdruck aus "Praktische Enzymologie", Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart, 1968:15-52

18. RASMUSSEN, L.E. and KLATZO, I.: Protein and enzyme changes in cold injury edema
Acta neuropath.(Berl.) 13, (1969):12-28

19. SHUTTLEWORTH, E. and ALLEN, N.: Early differentiation of chronic meningitis by enzyme assay
Neurology (Minneap.) 6, (1968):534-542

20. SITZMANN, F.C.: Untersuchungen über Enzymaktivitäten im Liquor cerebrospinalis bei Kindern mit Encephalitis, seröser Meningitis und Hydrocephalus
Z.Kinderheilk. 106, (1969):76-88

21. SCHMIDT, R.M.: Der Liquor cerebrospinalis
VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1968

22. VERREY, F.: Die diagnostische Bedeutung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, der Glutamat-Pyruvat-Transaminase, der Lactat-Dehydrogenase und der Sorbit-Dehydrogenase des Liquors im Kindesalter
Enzymol.biol.clin. 2, (1962/63):233-245

23. WARBURG, O.: Neue manometrische Zweigefäßmethode
Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 348, (1967):1677-1682

24. WARBURG, O., GAWEHN, K. und GEISSLER, A.W.: Manometrie der Körperzellen unter physiologischen Bedingungen
Z.Naturforschung 12b, (1957):115-118

25. WIECHERT, P. und BRETSCHNEIDER, T.: Untersuchungen zur Peptidaseaktivität im Liquor cerebrospinalis
Dtsch.Z.Nervenheilk. 195, (1969):26-32

26. WOLINTZ, H., JACOBS, L.D., CHRISTOFF, N., SOLOMON, M. and CHERNIK, N.: Serum and cerebrospinal fluid enzymes in cerebrovascular disease
Arch.Neurol. 20, (1969):54-61

Verzeichnis der Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphorsäure
ALD	Aldolase
ATP	Adenosin-5'-triphosphorsäure
CHA	Cyclohexylammonium
Cycl. AMP	Cyclische Adenosin-2'-monophosphorsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
F-1-P	Fructose-1-phosphat
F-6-P	Fructose-6-phosphat
F-1,6-P_2	Fructose-1,6-diphosphat
GAP	D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphat-diäthyl-acetal
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
Glycerat-2-P	Glycerat-2-phosphat
Glycerat-3-P	Glycerat-3-phosphat
Glycerat-1,3-P_2	Glycerat-1,3-diphosphat
Glycerat-2,3-P_2	Glycerat-2,3-diphosphat
G-1-P	Glucose-1-phosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-1,6-P_2	Glucose-1,6-diphosphat
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin- dinucleotid reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat reduziert
P_i	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenol-pyruvat
PGK	3-Phosphoglycerat-Kinase
PK	Pyruvat-Kinase
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TRA	Triäthanolamin-Hydrochlorid
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan

L e b e n s l a u f

Am 12. Juli 1937 wurde ich, Dieter Trautmann, als Sohn des Polizeibeamten Adolf Trautmann und dessen Ehefrau Elisabeth, geb. Emser, in Homburg/Saar geboren.

Von 1943-48 besuchte ich dort die Volksschule, anschließend das Real-Gymnasium in Homburg und das Städt. Neusprachliche Gymnasium in Zweibrücken. Dort legte ich am 3. März 1958 die Reifeprüfung ab.

Im Sommer-Semester 1958 begann ich an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken das Studium der Medizin. Nach nicht bestandener Ärztlicher Vorprüfung immatrikulierte ich mich an der Johann-Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main für das Studium der Zahnheilkunde und legte im Winter-Semester 1964 an der Philips-Universität in Marburg die Zahnärztliche Vorprüfung ab. Ab Sommer-Semester 1964 studierte ich wieder an der Universität des Saarlandes in Homburg, wo ich nach dem Sommer-Semester 1966 die Zahnärztliche Prüfung mit der Note "gut" bestand.

Von Dezember 1966 bis einschließlich März 1967 war ich in Dillingen/Saar als Assistenzzahnarzt tätig. Seit April 1967 bin ich als Zahnarzt in Steinwenden/Pfalz beschäftigt.

Herrn Professor Dr. med. F. LOEW, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes, danke ich für die Überlassung des Themas und die Anregungen zu der vorliegenden Arbeit.

Gleichzeitig danke ich Herrn Dr. rer. nat. J. DITTMANN, Leiter des Neurochemischen Labors der Neurochirurgischen Universitäts-Klinik, für seine wertvolle Unterstützung und Hilfe bei der Abfassung der Arbeit.